

10/089986

JO15R 08 APR 2002

DOCKET NO.: 221609US0PCT

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

IN RE APPLICATION OF: Keiko KUROSAWA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/06527

INTERNATIONAL FILING DATE: September 22, 2000

FOR: GENE ENCODING PROTEIN CAPABLE OF REGENERATING LUCIFERIN, NOVEL  
RECOMBINANT DNA, AND PROCESS FOR PRODUCING PROTEIN CAPABLE OF  
REGENERATING LUCIFERIN

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that  
the applicant claims as priority:

**COUNTRY**  
Japan

**APPLICATION NO**  
11-285258

**DAY/MONTH/YEAR**  
06 October 1999

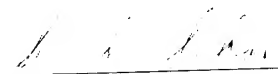
Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the  
International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/06527.

Respectfully submitted,  
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220  
(OSMMN 1/97)

  
Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618  
Surinder Sachar  
Registration No. 34,423



REC'D 15 NOV 2000

WIPO

PCT

10/089986  
PCT/JP00/06527

22.09.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

EU

JP00/1573

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年10月6日

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第285258号

出願人  
Applicant(s):

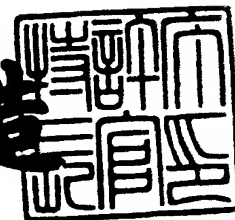
キッコーマン株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3087648

【書類名】 特許願

【整理番号】 P2113

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

    【氏名】 黒澤 恵子

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県野田市野田 2 5 0 番地キッコーマン株式会社内

    【氏名】 梶山 直樹

【特許出願人】

    【識別番号】 000004477

    【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

    【代表者】 茂木 友三郎

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 027993

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、新規な組み換え体DNA及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項2】 発光能力を有する生体由来の請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 発光能力を有する生体が、甲虫類である請求項2記載の遺伝子。

子。

【請求項4】 発光能力を有する生体が、ホタルである請求項2記載の遺伝子。

【請求項5】 発光能力を有する生体が、北米産ホタルである請求項2記載の遺伝子。

【請求項6】 発光能力を有する生体が、アメリカホタルである請求項2記載の遺伝子。

【請求項7】 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質

【請求項8】 配列番号2に示されるアミノ酸配列と50%以上の同一性があり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子。

【請求項9】 請求項1～8記載のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNA。

【請求項10】 請求項9記載の組み換え体DNAを含む形質転換体または形質導入体。

【請求項 1 1】請求項 1 0 記載の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、新規な組み換え体 D N A 及びルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ルシフェリンは、生物発光酵素ルシフェラーゼの基質であり、ルシフェラーゼによる発光後オキシルシフェリンに変換される。ルシフェラーゼを用いた A T P 測定法は、医療や食品衛生分野で広く使われているが、基質として用いられるルシフェリンが高価であること、また、ルシフェラーゼ反応が反応後生成されるオキシルシフェリンにより阻害されることから、オキシルシフェリンの除去、またはルシフェリンへの再生がルシフェラーゼ A T P 測定法の発展をさらに進めるものと考えられる。オキシルシフェリンをルシフェリンに再生することのできるホタル由来のタンパク質が見い出されている (U.S.Pat.No.5814504) が、ホタル体内からは、微量にしか抽出できず、工業的な利用は困難であった。

ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応系に添加すれば、発光を持続させることができ、また使用するルシフェラーゼ及びルシフェリンの使用量を軽減させることができる。

【0 0 0 3】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を生産する組み換え体を用いるルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法を提供することを目的とする。

【0 0 0 4】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者等は、上記目的に鑑み鋭意検討を行なった結果、甲虫類に属する昆虫由来のルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の単離、及び遺伝子の構造を決定し、更にまた、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを得ることに成功した。次いで、この組み換え体DNAを宿主細胞に含ませた形質転換体または形質導入体を培養すると、効率よくルシフェリン再生能力を有するタンパク質が生産されること等を見出し、本発明を完成した。

【0005】

即ち、本願の第1の発明は、オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子である。

本願の第2の発明は、発光能力を有する生体由来の上記の遺伝子である。

本願の第3の発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質をコードするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子である。

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質

本願の第4の発明は、配列番号2に示されるアミノ酸配列と50%以上の同一性があり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子である。

本願の第5の発明は、上記のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNAである。

本願の第6の発明は、上記組み換え体DNAを含む形質転換体または形質導入体である。

本願の第7の発明は、上記の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法である。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子は、甲虫類より得られる。

【0007】

本発明のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子は、例えば、次のようにして得ることができる。

まず、アメリカホタル発光器より mRNA を抽出する。

次いで、精製したルシフェリン再生能力を有するタンパク質のアミノ酸配列、アメリカホタルのコドン使用頻度を考慮して、合成 DNA を作製し、上記で得られた mRNA を鋳型として、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（以下、RT-PCR法と略称する。）を行ない、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質の一部をコードする DNA を得る。

【0008】

上記で得られた mRNA より逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、そのまま、または PCR 法を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を増幅した後、常法に従いベクター DNA に組み込む。用いられるベクター DNA としては、例えば、pUC19（宝酒造社製）、pBR322（宝酒造社製）、pBluescript SK+（Stratagene社製）、pMAL-C2（NEW England Labs社製）等のプラスミド DNA、λ ENBL3（Stratagene社製）、λ DASH II（フナコシ社製）等のバクテリオファージ DNA 等が挙げられる。得られた組み換え体 DNA を用いて、例えば、大腸菌 K-12、好ましくは大腸菌 JM109（東洋紡社製）、DH5α（東洋紡社製）、XL1-Blue（フナコシ社製）等を形質転換または形質導入して夫々の形質転換体または形質導入体を得る。宿主細胞としては、上記以外に、例えば、大腸菌 K-12 以外の大腸菌等の細菌、酵母、かび、放線菌、蚕、動物細胞等が用いられる。

【0009】

この形質転換は、例えば、D.M.Morrisonの方法（Method in Enzymology, 68, 326-331, 1979）により行なうことができる。また、形質導入は、例えば、B.Hohnの



方法 (Method in Enzymology, 68, 299-309, 1979) により行なうことができる。

#### 【0010】

上記形質転換体または形質導入体より純化された新規な組み換え体DNAを得るには、例えば、P. Guerry等の方法 [J. Bacteriology, 第116巻、第1064~1066頁(1973年)]、D. B. Clewellの方法 [J. Bacteriology, 第110巻、第667~676頁(1972年)] 等により得ることができる。

#### 【0011】

更に、上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAを用いて、後述の実施例項目(9)に示す373ADNAシーケンス・システム(パーキンエルマー社製)を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の全塩基配列の解析を行ない(配列番号1参照)、次いで、前記塩基配列を有する遺伝子によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸の一次配列を確定する。(配列番号2参照)

#### 【0012】

なお、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数、好ましくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、ルシフェリン再生能力を有するアミノ酸配列をコードするルシフェリン再生能力を有するタンパク質遺伝子は、全て本発明に含まれる。

また、配列番号2に示されるアミノ酸配列と50%以上の同一性があり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子は、全て本発明に含まれる。

#### 【0013】

そして、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されており、かつ、ルシフェリン再生能力を有するアミノ酸配列をコードするルシフェリン再生能力を有するタンパク質遺伝子を得るには、如何なる方法でもよく、例えば、遺伝子に点変異または欠失変異を生じさせるための周知技術である部位特定変異誘導法、遺伝子を選択的に開裂し、次いで、選択されたヌクレオチドを除去または付加し、遺伝子を連結する方法、オリゴヌクレオチド変異誘導法等が挙げられる。

## 【0014】

上記のようにして得られたルシフェリン再生能力を有する形質転換体または形質導入体、例えば、エッシェリシア属に属する菌株を用いてルシフェリン再生能力を有するタンパク質を生産するには、下記のようにして行なうことができる。

上記微生物を培養するには、通常の固体培養法で培養してもよいが、なるべく液体培養法を採用して培養するのが好ましい。

## 【0015】

また、上記微生物を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、コーンステイアプリカーあるいは大豆もしくは小麦麴の浸出液等の1種以上の窒素源に、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄あるいは硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。

## 【0016】

なお、培地の初発pHは、7～9に調整するのが適当である。また培養は、30～42℃、好ましくは37℃前後で6～24時間、通気攪拌深部培養、振とう培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物よりルシフェリン再生能力を有するタンパク質を採取するには、通常の酵素採取手段を用いることができる。

## 【0017】

培養物から、例えば、濾過、遠心分離等の操作により菌体を分離し、洗菌する。この菌体からルシフェリン再生能力を有するタンパク質を採取することが好ましい。この場合、菌体をそのまま用いることもできるが、超音波破碎機、フレンチプレス、ダイナミル等の種々の破壊手段を用いて菌体を破壊する方法、リゾチーム等の細胞壁溶解酵素を用いて菌体細胞壁を溶解する方法、トリトンX-100等の界面活性剤を用いて菌体から酵素を抽出する方法等により、菌体からルシフェリン再生能力を有するタンパク質を採取するのが好ましい。

## 【0018】

このようにして得られた粗ルシフェリン再生能力を有するタンパク質液からル

シフェリン再生能力を有するタンパク質を単離するには、通常の酵素精製に用いられる方法が使用できる。例えば、硫安塩析法、有機溶媒沈澱法、イオン交換クロマトグラフ法、ゲル濾過クロマトグラフ法、吸着クロマトグラフ法、電気泳動法等を適宜組み合わせて行なうのが好ましい。

【0019】

得られたルシフェリン再生能力を有するタンパク質は、オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生することができる。

(ルシフェリン再生能力測定法)

(試薬)

- A 0.1mM オキシルシフェリン
- B 0.01mM D-システイン
- C 25mM グリシルグリシン+5.4mM 硫酸マグネシウム
- D 10mM ATP (pH7.8)
- E 5mg/ml ルシフェラーゼ

【0020】

(手順)

- 1 下記反応混液を調製する。

0.005ml A

0.010ml B

0.085ml C

- 2 タンパク質溶液0.01mlを添加し、37℃で一定時間反応させる。

- 3 反応液0.01mlとC0.1mlを混合する。

- 4 下記ルシフェラーゼ混液を調整する。

10ml D

1ml E

- 5 項目3の混合液に項目4の混液を0.1ml添加し、ルミノメーターで発光量を測定する。

【0021】

【実施例】

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

## 【0022】

### 【実施例1】

#### (1) アメリカホタル mRNA の調製

アメリカホタル尾部（シグマ社製）10gを乳鉢と乳棒を用いて粉碎したものを、RNA抽出試薬 ISOGEN（和光純薬社製）10mlに懸濁し、2700 r.p.m.で5分間遠心分離することによりRNA画分を得た。これより、Current Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 1989) 記載の方法に従い、mRNA 0.51mgを得た。

## 【0023】

#### (2) プライマーの合成

項目(1)により精製したルシフェリン再生能力を有するタンパク質約10 $\mu$ gをプロテインシークエンサー（パーキンエルマー社製）に供し、N末端アミノ酸配列を決定した。また、項目(1)により精製したルシフェリン再生能力を有するタンパク質約10 $\mu$ gをトリプシン消化し、HPLCで分取したペプチド6個をプロテインシークエンサーに供し、内部アミノ酸配列を決定した。更に、アメリカホタルのコドン使用頻度を検討した。これらの情報により配列番号3及び4に記載したプライマーをアマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社のカスタム受託合成により合成した。

## 【0024】

#### (3) RT-PCR

反応液を以下の組成で調製し、42℃で30分逆転写反応を行なった後、99℃で5分間変性させ、5℃で保存した。

#### （反応組成液）

塩化マグネシウム	5mM
*10xRNA PCR バッファー	2 $\mu$ l
水	8.5 $\mu$ l
dNTP	各1mM
RNaseインヒビター	1U/ $\mu$ l

*AMV逆転写酵素XL	0.25U/ $\mu$ l
*oligo dTアダプタープライマー	0.125 $\mu$ M
mRNA	1 $\mu$ g

\*宝酒造社製

次いで、下記の組成で調製した反応液80 $\mu$ lを逆転写を行なったチューブに添加し、変性を94℃で30秒間、アニールを62℃で30秒間、伸長反応を72℃で1.5分間で30サイクルの反応条件でPCRを行なった。

(反応液組成)

プライマー (配列番号3)	0.2 $\mu$ M
プライマー (配列番号4)	0.2 $\mu$ M
*10×RNA PCR バッファー	8 $\mu$ l
塩化マグネシウム	2.5mM
*Taqポリメラーゼ	2.5ユニット

水

最終容量80 $\mu$ lになるよう加える。

\*宝酒造社製

PCR終了後、反応液をアガロースゲル電気泳動に供したところ、約0.75kbに目的の断片と思われるバンドが確認されたので、そのバンドを切り出し、GENECLEAN II (BIO 101社製) にて精製した。

【0025】

(4) 精製したDNA断片の塩基配列の決定及び解析

精製したDNA断片を373A DNA シークエンシス・システム (パーキンエルマー社製) を用いて塩基配列の決定及び解析を行なったところ、決定した塩基配列より予想されるアミノ酸配列に前述のアミノ酸配列 (His Glu Thr Gln Thr Leu Tyr Phe Val Asp Thr) が確認された。このことより、上記のRT-PCRで増幅したDNA断片にはルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の一部の配列が存在していることが確認された。

【0026】

(5) 3' RACEによる下流領域の解析

まず、上記のDNA配列解析よりプライマーを設計し、アマシャム・ファルマ

シアバイオテック社により合成した（配列番号5）。これと上記のmRNAと3'-Full RACE CoreSet（宝酒造社製）用いてRT-PCRを行ない、3'未知領域の増幅を行なった。反応液をアガロース電気泳動にかけ、約650bpのDNA断片をRecoChip（宝酒造社製）で精製抽出し、DNAシーケンサーで塩基配列の決定及び解析を行なったところ、決定した塩基配列の5'領域に上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の部分配列の3'配列と同じ配列を含むことが確認された。また、決定した塩基配列より予想されるアミノ酸配列に前述のアミノ酸配列（Ile Pro Asp Pro Gln Val Thr Ser Val Ala Phe Gly Gly Pro Asn Leu Asp Glu）が確認された。

## 【0027】

## (6)5' RACEによる上流領域の解析

先ず、上記のDNA配列解析よりプライマーを設計し、アマシャム・ファルマシアバイオテック社により合成した（配列番号6～9）。これと上記のmRNAと5'-Full RACE CoreSet（宝酒造社製）用いてRT-PCRを行ない、5'未知領域の増幅を行なった。反応液をアガロース電気泳動にかけ、約400bpのDNA断片をRecoChip（宝酒造社製）で精製抽出し、DNAシーケンサーで塩基配列の決定及び解析を行なったところ、決定した塩基配列に上記ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の部分配列と同じ配列を含むことが確認された。また、決定した塩基配列より予想されるアミノ酸配列に前述のアミノ酸配列（Gly Pro Val Val Glu Lys Ile Ala Glu Leu Gly Lys）が確認された。

## 【0028】

## (7)RT-PCRによる遺伝子断片の取得

上記3つの塩基配列より、翻訳開始コドンと終止コドンを推定し、N末領域とC末領域のプライマーDNAをアマシャム・ファルマシア・バイオテック社により合成した（配列番号10及び11）。これらと上記mRNAよりRT-PCRを行ない、反応液をアガロース電気泳動で解析した。その結果、約900bpのバンドが確認された。このバンドに含まれるDNA断片をRecoChip（宝酒造社製）で精製抽出し、更に制限酵素EcoRI及びPstI（いずれも宝酒造社製）で消化した。一方、プラスミドpKK223-3（ファルマシア社製）を制限酵素EcoRI及びPstIで消化後、アガ

ロース電気泳動により精製し、上記精製抽出したDNA断片とライゲーション反応を行ない、大腸菌JM109（東洋紡社製）を形質転換した。該形質転換株、即ち、大腸菌JM109(pLRE)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6908として寄託されている。

## 【0029】

## (8)活性の確認

大腸菌JM109(pLRE)菌体を、50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むTY培地（1% バクトトリプトン、0.5% バクトイースト・エキストラクト、0.5% NaCl、pH7.0）10mlにて37℃でクレット100まで振とう培養した後、IPTGを終濃度1 mMとなるよう添加し、更に4時間培養した。この培養液を氷上で冷却下、超音波破砕器(Ultrasonic generator、Nissei社製)を用いて20秒4回処理した。これをエッペンドルフチューブに入れ、微量遠心機を用い、12,000r.p.m.で10分間遠心分離し、上清画分及び沈殿画分に分離し、上清を別のエッペンドルフチューブに移しかえ、前述した酵素活性測定法によりルシフェリン再生能力を測定したところ、ベクターのみを含む大腸菌は、0.94 kcount/mlであるのに対し、大腸菌JM109(pLRE)は、10.58 kcount/mlとルシフェリン再生能力を有していた。

## 【0030】

## (9)ルシフェリン再生能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の解析

大腸菌JM109(pLRE)のルシフェリン再生能力が確認されたので、pLREの挿入断片がルシフェリン再生能力を有するタンパク質の遺伝子を含むことが明らかとなった。そこで、このプラスミドDNAについて373ADNAシーケンス・システム（パーキンエルマー社製）を用いて塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列を配列番号1に、また、該DNA配列から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号2に夫々示した。ルシフェリン再生能力を有するタンパク質の遺伝子は、924bpのコーディング領域を有し、308個のアミノ酸をコードしていた。

## 【0031】

## 【発明の効果】

本発明によれば、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質を効率よく生産す

ることができるので、本発明は、産業上極めて有用である。

【 0 0 3 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KIKKOMAN CORPORATION

<120> A gene coding protein having the ability to regenerate luciferin, novel recombinant DNA, process for the preparation of protein having the ability to regenerate luciferin

<130> P2113

<160> 11

<210> 1

<211> 924

<212> DNA

<213> Photinus pyralis

<400> 1

atggggccag ttgttgaaaa aattgcagaa cttggcaagt atacggttgg agaaggtcct 60

cactgggatc atgaaactca gacctatat ttcgtcgaca ccgtagagaa aacttttcat 120

aaatatgtac cttctcagaa aaaatacacg ttttgtaaag tagataaact ggtttctttc 180

attattcccc ttgctggatc ccctggccgt tttgtagtca gtttggaacg tgaaatagcc 240

attcttacat gggatggcgt tagtgctgca cctacaagca tagaagctat tgттаatgtc 300

gaaccacaca ttaaaaataa cagactcaat gatggcaaag cagatcccct tggcaatcta 360

tggacaggta caatggctat tgacgctggt ctccccgtag gaccggtcac tggcagttta 420



tatcatttag gggctgataa aaaggtaaaa atgcacgaga gcaacatagc tatagcaaat 480

gggctcgctt ggagtaatga ttgaagaaa atgtattata ttgattcggg gaaaagaaga 540

gtagacgagt acgattatga tgcttctaca ttatccatca gcaatcaacg gccattattt 600

acttttgaaa agcatgaagt gcctggatat ccagatgggc aaacaattga tgaggagggt 660

aatattatggg ttgccgtttt ccaaggacag cgaattatta aaatcagtac ccaacaaccg 720

gaagtgttac tggataccgt aaaaatacca gatcctcagg tcacctctgt agcatttggc 780

ggtccgaatt tggatgaact gcatgtaaca tctgctgggc ttcagcttga cgacagttct 840

ttingacaaaa gtttagttaa tgggcacgct tacagagtaa caggtttagg cgtcaaaggt 900

ttcgcgggag ttaaagtga gcta 924

[ 0 0 3 3 ]

<210> 2

<211> 308

<212> PRT

<213> Photinus pyralis

<400> 2

Met Gly Pro Val Val Glu Lys Ile Ala Glu Leu Gly Lys Tyr Thr Val

1

5

10

15

Gly Glu Gly Pro His Trp Asp His Glu Thr Gln Thr Leu Tyr Phe Val

20

25

30

Asp Thr Val Glu Lys Thr Phe His Lys Tyr Val Pro Ser Gln Lys Lys

35

40

45

Tyr Thr Phe Cys Lys Val Asp Lys Leu Val Ser Phe Ile Ile Pro Leu			
50	55	60	
Ala Gly Ser Pro Gly Arg Phe Val Val Ser Leu Glu Arg Glu Ile Ala			
65	70	75	80
Ile Leu Thr Trp Asp Gly Val Ser Ala Ala Pro Thr Ser Ile Glu Ala			
85	90	95	
Ile Val Asn Val Glu Pro His Ile Lys Asn Asn Arg Leu Asn Asp Gly			
100	105	110	
Lys Ala Asp Pro Leu Gly Asn Leu Trp Thr Gly Thr Met Ala Ile Asp			
115	120	125	
Ala Gly Leu Pro Val Gly Pro Val Thr Gly Ser Leu Tyr His Leu Gly			
130	135	140	
Ala Asp Lys Lys Val Lys Met His Glu Ser Asn Ile Ala Ile Ala Asn			
145	150	155	160
Gly Leu Ala Trp Ser Asn Asp Leu Lys Lys Met Tyr Tyr Ile Asp Ser			
165	170	175	
Gly Lys Arg Arg Val Asp Glu Tyr Asp Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ser			
180	185	190	
Ile Ser Asn Gln Arg Pro Leu Phe Thr Phe Glu Lys His Glu Val Pro			
195	200	205	
Gly Tyr Pro Asp Gly Gln Thr Ile Asp Glu Glu Gly Asn Leu Trp Val			
210	215	220	
Ala Val Phe Gln Gly Gln Arg Ile Ile Lys Ile Ser Thr Gln Gln Pro			
225	230	235	240
Glu Val Leu Leu Asp Thr Val Lys Ile Pro Asp Pro Gln Val Thr Ser			
245	250	255	
Val Ala Phe Gly Gly Pro Asn Leu Asp Glu Leu His Val Thr Ser Ala			
260	265	270	
Gly Leu Gln Leu Asp Asp Ser Ser Leu Asp Lys Ser Leu Val Asn Gly			

275                      280                      285  
His Val Tyr Arg Val Thr Gly Leu Gly Val Lys Gly Phe Ala Gly Val

290                      295                      300  
Lys Val Lys Leu

308

【 0 0 3 4 】

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gttggagaag gaccgatttg ggat                      24

【 0 0 3 5 】

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tcatccaagt tggggccgcc aaacgcgac                      29

【 0 0 3 6 】

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

ggacaggtac aatggctatt                      20

【 0 0 3 7 】

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

atcgtactcg tctactcttc 20

【 0 0 3 8 】

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

taggtgcagc actaacgcc a tc 22

【 0 0 3 9 】

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttcacgttcc aaactgacta c 21

【 0 0 4 0 】

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ctcgcgtgga gtaatgattt gaa 23

【 0 0 4 1 】

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

ggaattcatg gggccagttg ttgaaaaaat tgc 33

【0 0 4 2】

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

aactgcagtc atagcttcac tttaactccc gcgaa 35

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 オキシルシフェリンとD-システインに作用してルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子、

発光能力を有する生体由来の上記の遺伝子、

以下の(a)または(b)のタンパク質をコードするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子、

(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質

配列番号2に示されるアミノ酸配列と50%以上の同一性があり、かつルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質遺伝子、

上記のルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子をベクターDNAに挿入したことを特徴とする新規な組み換え体DNA、

上記組み換え体DNAを含む形質転換体または形質導入体及び

上記の形質転換体または形質導入体を培地に培養し、培養物からルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質を採取することを特徴とするルシフェリンを再生する能力を有するタンパク質の製造法。

【効果】 本発明によれば、ルシフェリン再生能力を有するタンパク質を効率よく生産することができるので、本発明は、産業上極めて有用である。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第285258号
受付番号	59900978675
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年10月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年10月 6日
-------	-------------

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 P2113A

【提出日】 平成11年10月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第285258号

【補正をする者】

【事件との関係】 特許出願人

【識別番号】 000004477

【氏名又は名称】 キッコーマン株式会社

【代表者】 茂木 友三郎

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 受託証

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 受託証（写し） 1



国際様式 INTERNATIONAL FORM



特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い  
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名 (名称) キッコーマン株式会社  
取締役社長 茂木 友二郎  
寄託者 あて名 〒 千葉県野田市野田 250 番地

19919000021



1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 JM109 (pLR3)	(受託番号) FERM BP- 6908
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 10 月 4 日 (原寄託日) に受領した 1 種の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 種の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大峯 俊 Dr. Shigeaki Ohsawa Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1-3 番地 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p> <p>平成 11 年 (1999) 10 月 4 日</p>	

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第285258号
受付番号	19919000021
書類名	手続補正書
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成11年11月18日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】	申請人
【識別番号】	000004477
【住所又は居所】	千葉県野田市野田250番地
【氏名又は名称】	キッコーマン株式会社
【提出された物件の記事】	
【提出物件名】	受託証（写し） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000004477]

1. 変更年月日	1999年 8月16日
[変更理由]	住所変更
住 所	千葉県野田市野田250番地
氏 名	キッコーマン株式会社

